

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SI ANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03027398 A**(43) Date of publication of application: **05.02.91**

(51) Int. Cl.

**C07K 5/06**  
**C07K 1/14**  
**// A23L 1/236**(21) Application number: **01160960**(22) Date of filing: **26.06.89**(71) Applicant: **MITSUI TOATSU CHEM INC**(72) Inventor: **AJIOKA MASANOBU**  
**HIGUCHI CHOJIRO**  
**OURA TAKESHI**  
**KATO TOSHIO**  
**YAMAGUCHI TERUHIRO****(54) CRYSTALLIZATION OF**  
**ALPHA-L-ASPARTYL-L-PHENYLALANINE**  
**METHYL ESTER**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain large crystal without adhesion of crystal to the wall of container by dissolving  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in an aqueous solvent to give a solution and pouring the solution to a solution suspending crystal of the compound while mechanically stirring.

CONSTITUTION:  $\alpha$ -L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl

ester is dissolved in an aqueous solvent to give a solution, which is poured to a solution suspending crystal of  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester while mechanically stirring to crystallize  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&amp;Japio

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-27398

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月5日

C 07 K 5/06

A

8318-4H

// A 23 L 1/14  
1/236

C

7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称  $\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの晶析方法

⑯ 特 願 平1-160960

⑰ 出 願 平1(1989)6月26日

⑱ 発 明 者 味 岡 正 伸 神奈川県横浜市戸塚区上倉田町1172-3  
 ⑱ 発 明 者 樋 口 長 二 郎 神奈川県鎌倉市台4-5-13  
 ⑱ 発 明 者 大 浦 剛 神奈川県逗子市久木4-10-8  
 ⑱ 発 明 者 加 藤 敏 雄 神奈川県川崎市高津区上作延600-1  
 ⑱ 発 明 者 山 口 彰 宏 神奈川県鎌倉市材木座1-13-24  
 ⑲ 出 願 人 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

明 示 部

## 1. 発明の名称

 $\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの晶析方法

## 2. 特許請求の範囲

$\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルを水性溶媒に溶解した溶液を、 $\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの結晶を懸濁した溶液中に機械的攪拌を行いながら装入することによる $\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの晶析方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、溶解性の改良された $\alpha$ -L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル(以下 $\alpha$ -APMと略す)の晶析法に関する。

さらに詳しくは、 $\alpha$ -APMを水性溶媒に溶解した溶液を、 $\alpha$ -APMの結晶を懸濁した溶液中に機械的攪拌を行いながら装入して溶解性の高い

$\alpha$ -APMを製造する方法に関するものである。

$\alpha$ -APMはジペプチド系の甘味料として広く知られている。良質な甘味特性ならびに蔗糖の200倍近い高甘味度を有し、ダイエット甘味料としてその需要が大きく伸びているものである。

(従来技術及び問題点)

$\alpha$ -APMは、L-アスパラギン酸とL-フェニルアラニンメチルエステルとからなるジペプチド化合物であり、その製法は化学的な方法と微生物を利用した生化学的な方法に大別され、それぞれ種々の方法が開示されている。

化学的な製法としては、アミノ基を保護したL-アスパラギン酸無水物とL-フェニルアラニンメチルエステルを適当な媒体中で縮合させたのち、常法によって保護基を脱離させて製成する方法(例えば米国特許 3,786,039号)が代表的製法の一つである。また、生化学的製法としては、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸とL-フェニルアラニンメチルエステルを金属プロテアーゼの存在下に縮合させ、N-ベンジルオ

キシカルボニル-α-ヒドロキシパルチル-ヒド  
 ェニルアラニンメチルエステルを製造したのち、  
 脱離剤によりベンジルオキシカルボニル基を除去して製造する方法を挙げることができる。工業的にα-AMPを製造する場合、いずれの製造法を利用するにしてもα-AMPを単離して最終製品とするに際し、粗製のα-AMPを精製する工程は不可欠である。この精製工程は、通常、水または含水低級アルコール（以下、水および水を含む溶媒を水性媒体という）からの再結晶精製によるのが一般的である。また、粗製のα-AMPの品質によっては水性媒体中、懸濁状態で攪拌処理して不純物を除去する方法も行われている。しかしながら、このような精製法によって得られるα-AMPは、乾磨時に固いブロックを形成し、その為、粉碎して製品化する必要があり、取り扱いに難点を生じ易い傾向がある。また乾燥に長時間要し、その為にα-AMPの分子内環化物である5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジノ酢酸メチルエステル(DKP)が増加し易い傾向

があり、安定した品質を有する製品を得る上でも問題点のある方法と云わざるを得ない。加えて、この従来の再結晶精製法で得られるα-AMPは、製品の水への溶解性（溶解速度）が劣るという欠点を持ち合わせている。例えば、50%メタノール水溶液（体積比）からの再結晶で得たα-AMPの場合、その粉砕品の250mgを250mlの水に室温で攪拌下に投入し、30秒毎に攪拌と静置を繰り返してその溶解性を調べたところ、5分後においても未溶解のα-AMPがかなりの量残存しており、完全に溶解するまでには15分以上の時間を必要とする。また水から再結晶精製して得たα-AMPの溶解性もほぼ同程度である。

α-AMPのこの水への溶解性は、α-AMPの甘味剤としての需要分野の大半が清涼飲料への利用である現状から、最終製品の重要な品質の一つになることは明らかである。α-AMPの溶解性を改良することに関する先行技術は少ない。特開昭58-177952号公報にはα-AMPを水性溶媒から冷却品析するにあたって、α-AMPの初期

濃度を2〜10重量%の設定した水性溶液を機械的攪拌等の強制流動を与えることなく伝導伝熱支配下に冷却し、全体を見掛け上氷果（シャーベット）状の類似固相と成したのち、必要に応じて冷却することによってα-AMPの結晶を改良し、さらに透過性の改善ならびに高比重等の粉体特性の改良を行っている。そして、この方法で得られるα-AMPは従来品に比較して溶解性の点でも優れていることが記載されている。しかしながら、この方法は確かに溶解性を含めた種々の粉体特性は改良されるが、水性溶液からの品析に際して、機械的攪拌等の強制流動を与えることなく冷却して品析させる方法をほる必要があるので、通常の品析装置では、スケールが大きくなるに伴い、冷却に著しく長時間を要し工業的には限界を生じる。したがって、この先行技術では冷却時間を短縮するために、冷却面から被冷却体への最大距離を規定し、それに見合った特殊な品析装置を提案している。このように特開昭58-177952号公報記載の方法は特殊な品析装置を使用しない限り工業的な

方法とはなりえない。

〔問題を解決するための手段〕

本発明者らは、以上の製造法の欠点を解決するために鋭意検討した結果、α-AMPを水性溶媒に溶解した溶液を、α-AMPの結晶を懸濁した溶液中に機械的攪拌を行いながら投入すると、過飽和の状態から急激に結晶が析出しないために、器壁への結晶の付着がなく、また透過性の良い大きな結晶が得られること、さらに得られた懸濁液を固液分離して乾燥したα-AMPは、水に対する溶解性にすぐれていることを見出し本発明を完成した。

本発明の方法に供されるα-AMPは、その製法により限定されるものではなく、種々の方法によって製造されるα-AMPが使用される。

本発明の方法は、溶媒として、通常水あるいはメタノール、エタノール、イソプロパノールまたは第3級ブタノールなどの低級アルコールを含む水性媒体が用いられる。勿論、本発明の目的を損なわない範囲においてその他の水と混和する有機

溶媒の使用も可能である。低級アルコールを含む水性媒体を溶媒として用いる場合、低級アルコールの濃度は60重量%程度までなら特に問題なく使用できる。

これらの水性媒体の使用量は、 $\alpha$ -AMPを溶解するに十分な量が必要であり、水性媒体の組成や溶解温度により変わるが通常は7~50倍の範囲で使用される。溶媒として水を用いる場合は、 $\alpha$ -AMPの20~50倍の範囲で使用される。水の量がこれより少ないと、 $\alpha$ -AMPが完溶させることが困難になり、また、水の量がこれより多いと全体の容積が大きくなりすぎ、生産効率が悪くなり実用的でない。

$\alpha$ -AMPを溶解する温度は、20~70℃、好ましくは30~60℃の範囲で、これ以上低いと温度差を利用した再結晶の効率が悪くなり、これ以上高いと溶解した $\alpha$ -AMPが熱分解して甘味のないDKPや $\alpha$ -レーアスバルチル-レーフェニルアラニン( $\alpha$ -AP)等を生じる。

本発明において、 $\alpha$ -AMPを溶解した溶液を

はない。

本発明の方法を実施するには、まず $\alpha$ -AMPを高濃度の水性溶媒に溶解し、一方、前記溶液の一部を時間をかけて冷却するか、または、別途用意した $\alpha$ -AMP結晶を水性溶媒に分散して調整した懸濁液を冷却しておき、ここに高濃度の $\alpha$ -AMP溶液を追加する。添加する間、懸濁液の温度を規定値に保つように添加速度を調整する。その際、冷却能力により添加速度が左右される。

低温の懸濁液に添加された高温の $\alpha$ -AMP溶液は、急激に冷却されて結晶が析出し、冷却面に付着することなく操作性が良い。また、析出した結晶は濾過により分離し、乾燥することにより溶解性の良い $\alpha$ -AMPを得ることができる。

(作用)

通常行われている、 $\alpha$ -AMPの高温溶液を攪拌しながら冷却して結晶を析出させる方法では、得られる結晶は細かく、濾過性の悪いものである。また、冷却面に析出した結晶が付着し易く、断熱層を形成して冷却が非常に遅くなる。この結晶の

効入する懸濁液は、実施温度において溶解していない結晶状態の $\alpha$ -AMPが含まれたものである。

本発明における機械的攪拌とは、攪拌翼による攪拌混合や気泡の吹き込みによる強制対流等を意味し、晶析槽内を均一に混合して冷却面と懸濁液の接触を行い、冷却を効率的に行うものである。

この懸濁液の温度は、加える $\alpha$ -AMPの溶媒の温度よりも低ければ良いが、その温度差が小さいと再結晶の効率が悪くなるため、通常0~40℃、好ましくは0~30℃の範囲で本方法を実施する。

本方法において、 $\alpha$ -AMPを溶解した溶液を懸濁液に添加する速度は、懸濁液の温度を設定値に維持できる速度であれば良く、冷却速度に見合った速度で添成すれば良い。

本発明の方法は特別な装置を必要とせず、通常の回転攪拌槽にあらかじめ冷却した $\alpha$ -AMPのスラリーを仕込み、ここに $\alpha$ -AMPを溶解した溶液を添加していけば良い。攪拌の形式は析出した結晶を含む懸濁液が十分混合できるものであればどのような物でも良く、特に限定されるもので

性質は、攪拌速度、冷却速度を変えても容易に改善されるものではなかった。

これに対して、本発明の方法により得られた $\alpha$ -AMPの結晶は、通常の晶析法で得られる物に比べて大きく、50℃以上の高温で乾燥しても水に対する溶解性の良い $\alpha$ -AMPの製品を与える。また、本発明の方法は、結晶析出時に冷却面に付着して断熱層を形成することなく効率良く冷却することができる工業的に有効な晶析方法である。

(実施例)

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。尚、実施例中の溶解性試験は以下の方法によった。(溶解性試験方法)

粉砕した $\alpha$ -AMPのサンプル250mgを、26±2℃の純水250ml中に攪拌下(マグネチックスツローを用い350~360rpmで攪拌する)に投入し、30秒毎に攪拌と静置を繰り返し、試料が完溶するまでの時間を測定する。

実施例1

1Lのフラスコに水141.1gと $\alpha$ -AMPの粉末

5.9gを加えて懸濁状態とし、攪拌しながら外部を氷水で冷却して5℃に保つ。ここに、564.5gの水に0.5gのDKPを含む24.0gの粗 $\alpha$ -APMを溶解した60℃の溶液を20分をかけて滴下する。滴下中内部の攪拌状態は良好であり、フラスコの器壁への結晶の付着は認められない。滴下終了後、析出した結晶を60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含水率44%のウェットケーキを得た。収量46.0g。全 $\alpha$ -APMに対する収率は87.6%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.1%であった。

このケーキを50～60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、5分以内に完溶した。  
実施例2

1ℓのフラスコに水705.6gと0.7gのDKPを含む30.1gの粗 $\alpha$ -APMを60℃で溶解し、溶液の20%を別の1ℓフラスコに分取し5℃まで2時間をかけて冷却して結晶を析出させる。この懸濁液を攪拌しながら5℃に保ち、ここに残りの $\alpha$ -A

PMを20分かけて滴下する。滴下中懸濁液の攪拌状態は良好であり、結晶の器壁への付着はまったくなかった。滴下終了後、析出した結晶を60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含水率46.6%のウェットケーキを得た。収量47.8g。全 $\alpha$ -APMに対する収率は88.8%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.1%であった。

このケーキを50～60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、5分以内に完溶した。  
比較例

1ℓのフラスコに水705.6gと0.7gのDKPを含む30.1gの粗 $\alpha$ -APMを60℃で溶解し、攪拌しながら外部を25℃の水で冷却する。内部温度が下がるに従い、器壁に、析出した結晶が付着し、温度の降下が遅くなる。20分後内温が35℃になった所で外部を氷水に変えさらに5℃まで冷却するのに30分を要した。析出した結晶を60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含水率67.5%のウェットケーキを得た。収量79.6

g。収率は88.0%で、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.2%であった。

このケーキを50～60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、完溶するまでに25分を要した。

#### 実施例3

実施例1と同様の方法により結晶を析出させ、736.0gの懸濁液を得た。このうちの588.8gを60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含水率42%のウェットケーキを得た。収量34.5g。全 $\alpha$ -APMに対する収率は64.3%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は0.1%であった。

次に、上記操作で残った147.2gの懸濁液を攪拌下5℃に保ちながら、564.5gの水に0.5gのDKPを含む24.0gの粗 $\alpha$ -APMを溶解した60℃の溶液を20分かけて滴下する。滴下中懸濁液の攪拌状態は良好であり、結晶の器壁への付着はまったくなかった。滴下終了後、析出した結晶を60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、

20分後に含水率41%のウェットケーキを得た。収量44.4g。加熱溶解に用いた $\alpha$ -APMに対する収率は111.5%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.1%であった。用いた全 $\alpha$ -APMに対する総収率は87.4%であった。

このケーキを50～60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、5分以内に完溶した。  
実施例4

1ℓのフラスコに33.9gのメタノールと33.9gの水と $\alpha$ -APMの粉末5.9gを加えて懸濁状態とし、攪拌しながら外部を氷水で冷却して5℃に保つ。ここに、138.0gのメタノールと138.0gの水に0.5gのDKPを含んだ24.0gの粗 $\alpha$ -APMを50℃で溶解し、この溶液を20分かけて滴下する。滴下中内部の攪拌状態は良好であり、フラスコの器壁に結晶が付着することもない。滴下終了後、析出した結晶を60mmφの綱山ロートで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含水率33.2%のウェットケーキを得た。収量38.4g。全 $\alpha$ -APM

に対する収率は87.2%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.2%であった。

このケーキを50~60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、5分以内に溶解した。

#### 実施例5

1ℓのフラスコに46.2gのエタノールと46.2gの水と $\alpha$ -APMの粉末5.9gを加えて懸濁状態とし、攪拌しながら外部を氷水で冷却して5℃に保つ。ここに、188.0gのメタノールと188.0gの水に0.5gのDKPを含んだ24.0gの粗 $\alpha$ -APMを50℃で溶解し、この溶液を20分をかけて滴下する。滴下中内部の攪拌状態は良好であり、フラスコの器壁に結晶が付着することもない。滴下終了後、析出した結晶を60mmφの棚山ロータで30mmHgの減圧により濾過を行い、20分後に含液率37.5%のウェットケーキを得た。収量42.5g、全 $\alpha$ -APMに対する収率は90.3%であり、HPLCでの分析の結果、DKP含量は $\alpha$ -APMに対して0.2%であった。

このケーキを50~60℃で真空乾燥して得られた結晶の溶解性試験の結果、5分以内に溶解した。

出願人

三井重圧化学株式会社